

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 729 399

(21) N° d'enregistrement national : 95 00376

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 15/86, 5/10, A 61 K 48/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 13.01.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.07.96 Bulletin 96/29.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH —
FR.

(72) Inventeur(s) : MANDEL JEAN LOUIS, AUBOURG
PATRICK, MOSSER JEAN et SARDE CLAUDE
OLIVIER.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : ERNEST GUTMANN YVES
PLASSERAUD SA.

(54) VECTEUR RETROVIRAL RECOMBINANT EN VUE D'UNE CORRECTION DE L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE
PAR TRANSFERT DE GENE.

(57) L'invention concerne un vecteur rétroviral recombinant
comprenant:
- un fragment d'un ADNc du gène dont la mutation est
responsable d'adrénoleucodystrophie ou d'adrénoneuro-
myélopathie et qui code pour une protéine membranaire, et
- un vecteur rétroviral M48 dans lequel ledit fragment
d'ADN complémentaire est inséré au niveau d'un site de
restriction BamHI.

FR 2 729 399 - A1



**VECTEUR RETROVIRAL RECOMBINANT EN VUE D'UNE CORRECTION
DE L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE PAR TRANSFERT DE GENE.**

L'invention concerne un vecteur rétroviral recombinant porteur du fragment d'ADNc codant pour une protéine dont l'absence ou la mutation est responsable d'une maladie génétique, l'adrénoleucodystrophie (ALD), mais également d'adrénoneuromyélopathie dont le gène est localisé à l'extrémité Xq28 du chromosome X.

La présente invention concerne par ailleurs des cellules recombinantes modifiées par un tel vecteur rétroviral, ces cellules étant susceptibles d'être utilisées pour une implantation in vivo dans un but thérapeutique.

L'adrénoleucodystrophie est une maladie létale provoquant une démyélinisation progressive du système nerveux central, et causée par des mutations d'un gène codant pour une protéine appelé ALDp, localisé au niveau de la membrane peroxysomale. Cette maladie est associée à un défaut d'oxydation des acides gras à très longue chaîne, et en conséquence leur accumulation dans divers types de tissus.

Le gène dont la mutation peut conduire chez un patient à une pathologie de type adrénoleucodystrophie a été isolé et caractérisé par Mosser et al. (Nature n°361,726-730,1993).

Des travaux effectués par Singh et al. en 1984 (Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.81,4203-4207) puis Moser & Moser en 1991 [The Metabolic Basis of Inherited Disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.; McGraw-Hill, New York) pp.1511-1532] ont démontré que le principal trouble biochimique causé par l'ALD correspond à une oxydation défectueuse d'acides gras à très longue chaîne, ainsi qu'à leur accumulation dans la matière blanche cérébrale, les glandes surrénales, les fibroblastes et le plasma.

Une étude effectuée en 1992 par Singh et al. (J. biol. Chem. 267, 13306-13313) a montré que dans le cas des fibroblastes, les acides gras à très longue chaîne sont normalement transportés à travers la membrane peroxysomale. Parallèlement, il a été également démontré qu'un dysfonctionnement de la synthétase responsable de l'association du co-enzyme A et des acides gras à très longue chaîne empêche la β -oxydation de ceux-ci. Il semble que cette synthétase se situe également au niveau de la membrane peroxysomale (Hashmi et al., FEBS Lett. 196,247-250 ; Wanders et al., 1988 J; Inher. metab. Dis. 11 Suppl 2,173-177).

Plus récemment, la demande de brevet FR 2.108.606 a décrit l'identification ainsi que l'isolation du gène responsable de l'adrénoleucodystrophie. Les demandeurs y ont démontré que les troubles métaboliques étaient dus à une protéine de 75 kDa défectueuse destinée à s'intégrer dans la membrane du peroxysome.

Plusieurs approches thérapeutiques, incluant même un régime lipidique combinant l'administration de trioléate ainsi que de triérucate de glycérol, n'ont cependant pas permis de modifier l'évolution des lésions cérébrales dues à l'ALD.

Les inventeurs avaient par ailleurs montré qu'une transplantation de moelle osseuse pouvait inverser le processus de démyélinisation, conséquence indirecte de l'absence de protéine normale, si cette transplantation était effectuée à un stade de développement relativement précoce (Aubourg et al, 1990, New Engl. J. Med. 322, 1860-1866). Cependant, afin de contourner les problèmes relatifs à l'histocompatibilité, seule une transplantation autologue de cellules de moelle osseuse dans lesquelles on aurait introduit le gène normal pouvait être envisagée.

L'introduction de ce gène devait s'effectuer en ayant pris soin de choisir un vecteur compatible avec

le fragment d'ADNc inséré d'une part, et permettant l'expression d'une protéine destinée à s'intégrer dans la membrane peroxysomale d'autre part.

Les inventeurs ont alors constaté que le vecteur rétroviral M48 dérivé du rétrovirus Moloney Mo-MLV, et généralement préféré pour permettre l'expression des gènes codant pour des protéines solubles, pouvait également permettre l'expression d'un gène codant pour une protéine de structure, en l'espèce une protéine transmembranaire.

Cette solution, utilisant les techniques de la thérapie génique, comportait une première étape visant à étudier la possibilité de corriger in vitro le phénotype anormal de fibroblastes cutanés auquel l'ADNc du gène responsable de l'ALD aura été transfecté.

Les inventeurs ont pu alors observer que le but de l'invention, c'est-à-dire la correction du métabolisme de l'adrénoleucodystrophie, nécessitant l'intégration de la protéine normale dans la membrane du peroxysome, ne pouvait être atteint que par la combinaison du vecteur M48 et d'un fragment de l'ADNc codant pour ladite protéine.

L'invention concerne ainsi des vecteurs rétroviraux recombinants comprenant un fragment d'ADNc codant pour une protéine capable de s'intégrer dans la membrane peroxysomale des cellules dans lesquelles elle a été exprimée. Ces vecteurs rétroviraux recombinants ont la capacité d'infecter des cellules et en particulier des cellules eucaryotes.

L'invention concerne également des cellules recombinantes pouvant être administrées, ou implantées chez l'homme ou l'animal, seules ou en association avec un véhicule approprié et produisant in vivo la protéine à laquelle il a été fait référence ci-dessus.

Par ailleurs, l'utilisation à des fins thérapeutiques de ces vecteurs rétroviraux, ainsi que

des cellules recombinantes les contenant, est envisageable sur des sujets animaux y compris l'homme.

La protéine "normale" correspondant au gène "normal" qui, lorsqu'il est muté, peut conduire à un état pathologique de type ALD, n'ayant pas de dénomination biologique spécifique, seront définis en utilisant le terme correspondant à la maladie :

- le gène dénommé "gène normal de l'ALD" est le gène normal qui, lorsqu'il est muté, peut conduire à une pathologie de type adrénoleucodystrophie chez un patient. Il a été caractérisé dans la publication de Mosser et al. (Nature n°361, 726-730, 1993),
- le vecteur dénommé M48-ALD est un vecteur recombinant comprenant l'ADNc, codant pour une protéine dite normale, construit à partir du vecteur M48 décrit par Guild et al. (J.Virol 62, 3795-3801, 1988),
- l'ALDp normale est la protéine codée par le gène de l'ALD dont les anomalies sont génétiquement responsables de l'adrénoleucodystrophie,
- les fibroblastes ALD sont des fibroblastes des patients exprimant le phénotype biochimique pathologique de l'ALD.

La présente invention fournit des moyens permettant la transfection in vitro ou in vivo de cellules exprimant le gène dont les anomalies sont responsables de l'adrénoleucodystrophie. Ce vecteur rétroviral recombinant permet l'expression du gène normal ALD le cas échéant après intégration dans le génome des dites cellules.

Le vecteur choisi présentera par ailleurs une forte capacité d'infection des cellules, et confèrera de préférence une stabilité à long terme de l'expression du gène normal ALD présent le cas échéant sous forme intégrée dans le génome des cellules.

L'invention concerne donc un vecteur rétroviral recombinant caractérisé en ce qu'il comprend

- un fragment d'un ADNc du gène dont la mutation est responsable d'adrénoleucodystrophie ou d'adrénoneuromyélopathie, et qui code pour une protéine membranaire,
- un vecteur rétroviral M48 dans lequel ledit fragment d'ADNc est inséré au niveau d'un site de restriction BamHI.

Selon un premier mode de réalisation particulier de l'invention, le vecteur rétroviral recombinant est tel que l'expression de l'ADNc s'effectue sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase de souris.

Egalement selon l'invention, l'ADNc est un fragment SpeI-EcoRI d'une longueur de 2,43 kb.

Ce fragment correspond aux nucléotides 333 à 2750 de l'ADN complémentaire du gène de l'ALD dont la séquence a été publiée par Mosser et al. en 1993 (Nature 361, 726-730).

L'expression de ce fragment d'ADNc peut s'effectuer selon un autre mode de réalisation de l'invention sous le contrôle d'un LTR viral ou de promoteurs actifs uniquement dans les cellules souches hématopoïétiques, des cellules gliales du système nerveux central, notamment les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

Un schéma du vecteur rétroviral recombinant selon l'invention établi à partir du vecteur M48 est représenté à la figure 1.

Egalement selon l'invention, un vecteur rétroviral recombinant ci-dessus défini peut être en outre caractérisé en ce que le fragment d'ADNc code pour une protéine capable de s'intégrer dans la membrane d'un organe cellulaire, notamment le peroxysome lorsque ce vecteur est introduit dans une cellule hôte recombinante.

Selon d'autres modes de réalisation de l'invention, le vecteur rétroviral M48 est remplacé par un vecteur de type "Adéno-associated-virus", adénovirus ou un autre vecteur rétroviral, notamment MFG.

L'"adeno-associated virus" (AAV), pouvant servir d'auxiliaire de réplication à l'adénovirus, possède un ADN qui semble être capable de s'intégrer en un site particulier de l'ADN chromosomique.

La construction et l'expression d'un vecteur de type AAV ont d'ailleurs été décrites dans le cas spécifique d'un ADNc de beta-globuline (Dixit M, Gene 1991 ; 104 ; 253-7).

Ce vecteur, ainsi que le vecteur rétroviral MFG (OHASHI et al. PNAS vol.85 n°23 M 11332-11336-1992).

L'invention concerne par ailleurs des cellules recombinantes caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules ayant la capacité d'être tolérées immunologiquement par l'organisme auquel elles seraient administrées, ces cellules ayant été auparavant modifiées par le vecteur rétroviral de l'invention, c'est-à-dire répondant à la définition précédente.

Ces cellules peuvent être des cellules issues de l'organisme chez lequel elles doivent être implantées après transduction in vitro avec le vecteur de l'invention, ou des cellules dépourvues à leur surface d'antigènes reconnus par le système immunitaire de l'organisme chez lequel elles sont implantées, également transduites in vitro.

A titre préféré, ces cellules recombinantes sont des cellules souches hématopoïétiques, en particulier des cellules précoces, notamment la population cellulaire CT 34* ; de préférence il s'agit de cellules souches hématopoïétiques autologues par rapport au patient chez lequel on souhaite les implanter après leur modification par un vecteur selon l'invention.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, les cellules recombinantes sont des fibroblastes cutanés.

Il peut également s'agir de cellules constitutives du système nerveux, notamment d'oligodendrocytes ou de cellules microgliales.

Ainsi que précédemment décrit, ces cellules peuvent être modifiées par un vecteur recombinant codant pour un polypeptide déterminé, en l'occurrence la protéine ALDp, ce vecteur permettant l'expression du fragment d'ADN étranger -ici un ADNC- dans les cellules.

Ces cellules peuvent être modifiées par les méthodes dites de recombinaison homologue. La pénétration du vecteur dans les cellules est réalisée en utilisant l'électroporation ou, tel que ci-après décrit, une coprécipitation ADN-phosphate de calcium.

Toute autre méthode impliquant l'entrée d'un acide nucléique, soit seul, soit par l'intermédiaire d'un virus recombinant, entre également dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation de vecteurs ou de cellules recombinants selon l'invention, pour la préparation d'un médicament servant au traitement des maladies susceptibles d'être corrigées par l'expression du fragment d'ADNC tel que précédemment défini.

DESCRIPTIF DES FIGURES

Figure 1 : représentation schématique de la construction rétrovirale M48-ALD. Le gène complémentaire du gène de l'ALD, de la position 333 à 2750 de la séquence publiée par Mosser et al, Nature, 361, 726-730, 1993, a été inséré dans le site de clonage BamHI du vecteur M48 à la position 2727 de ce vecteur.

Figure 2 : intégration du provirus M48-ALD intact dans des fibroblastes ALD.

L'ADN génomique de fibroblastes cutanés normaux ainsi que de fibroblastes cutanés ALD, digérés par KpnI ainsi que le vecteur plasmidique ont été sondés au niveau de l'exon 13 de l'ADNc.

Ligne 1 : génome à 0,2 copie par cellule du plasmide M48-ALD ; ligne 2 : fibroblastes normaux ; ligne 3 : fibroblastes ALD n'ayant pas subi de transduction ; ligne 4 : fibroblastes ALD ayant subi une transduction par le vecteur Glu-3 ; ligne 5 : fibroblastes ALD ayant subi une transduction par le vecteur M48-ALD.

Figure 3 : transfert immunologique de l'ALDp dans des fibroblastes ALD avant et après correction avec le vecteur M48-ALD.

Ligne 1 : fibroblastes normaux ; ligne 2 : fibroblastes du patient 1 avant transduction ; ligne 3 : fibroblastes du patient 1 deux semaines après transduction ; lignes 4 et 6 : fibroblastes du patient 2 avant transduction ; ligne 5 : fibroblastes du patient 2 deux semaines après transduction ; ligne 7 : fibroblastes du patient 2 deux mois après transduction.

Figure 4 : expression et localisation de l'ALDp dans les fibroblastes ALD avant et après correction avec le vecteur M48-ALD.

A et C : fibroblastes de 2 patients atteints d'ALD avant correction ; B et D : fibroblastes du patient 1 atteint d'ALD.

Figure 5 : oxydation de l'acide lignocérique (A) et teneur d'acide hexacosanoïque (B) dans les fibroblastes de patient atteint d'ALD avant et après correction avec le vecteur M48-ALD.

- : fibroblastes n'ayant pas subi de transduction ; (1) : fibroblastes ayant subi une transduction et après dix jours de culture ; (2) : fibroblastes ayant subi une transduction et après deux mois de culture.

Figure 6 : vecteur M48 dans pBR 322 selon Danos et Mulligan.

Figure 7 : séquence de l'ADNc de la protéine impliquée dans l'ALD.

Exemple

Culture des Cellules

Ces cultures ont été effectuées à partir de fibroblastes immortalisés et de fibroblastes "normaux". Les résultats expérimentaux concernant l'expression de l'ALP normale et discutés ultérieurement se rapportent en conséquence aux fibroblastes non-immortalisés.

Les inventeurs ont dans un premier temps effectué des cultures de fibroblastes cutanés de patients ci-après dénommés JL et SM, respectivement atteints d'une forme infantile cérébrale d'ALD et d'adrénomyéloneuropathie. Ces cultures présentaient des fibroblastes ayant une forte teneur en acides gras à très longue chaîne, acides gras n'ayant en l'occurrence pas subi l'oxydation attendue en raison des anomalies du gène de l'ALD. Les cellules ont été maintenues dans un milieu DMEM additionné d'une solution à 10% en volume de sérum foetal de veau inactivé. Ces lignées de cellules sont caractérisées soit par une quasi-absence d'ALDp lors d'expériences d'immunofluorescence ou d'"immunoblotting", soit par une présence d'ALDp non fonctionnelle et donc défectueuse.

Des fibroblastes des patients JL et SM furent immortalisés par l'utilisation d'une construction virale contenant un gène codant pour l'antigène grand T de SV40 et recombines par le gène marqueur de sélection codant pour la néomycine phosphotransférase.

Les cellules produisant le rétrovirus (SV40 pop) dérivait du système vectoriel pZipNeoSV(X) décrit par Jat et al. en 1986 (Mol. Cell Biol. 6, 1204-1217).

Les fibroblastes ALD, immortalisés ou non par SV40 ainsi que la lignée cellulaire d'encapsulation ψ CRIP ont été cultivés dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de veau nouveau-né. Tous les milieux furent supplémentés avec de la glutamine 2mM, de la pénicilline à raison de 50 unités/ml et une sulfate de streptomycine à raison de 50 mg/ml.

Construction et encapsidation du vecteur rétroviral M48-ALD

Pour la suite entrepris la construction du vecteur rétroviral M48-ALD, les inventeurs ont alors isolé le fragment de 2,43 Kb SpeI-EcoRI de l'ADNc intégral codant pour l'ALDp humaine normale (Fig. 7). Après avoir été complété puis lié à un "linker" BclI, ce fragment a ensuite été inséré dans l'orientation sens au niveau d'un site de restriction BamHI du vecteur rétroviral M48 dérivé du rétrovirus de la leucémie murine de MoMuLV Moloney.

L'insertion a nécessité l'utilisation de linkers entraînant une modification des séquences en amont (5') et en aval (3') de l'ADNc du gène de l'ALD sans que ce dernier soit lui-même modifié. Ces modifications sont retrouvées sur la figure 1. Dans cette construction M48-ALD, l'expression de l'ADNc est sous le contrôle du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase de souris (PGK).

Parallèlement, un vecteur de contrôle GLU-3 a été obtenu par insertion du gène de la β -glucuronidase dans le même vecteur M48. Le vecteur PGK-néomycine, contenant un gène de résistance à la néomycine issu de TN5 (Moullier et al., 1993, Transplantation 56, 427-432) sous le contrôle du promoteur PGK, a été utilisé pour la sélection au G418 (Adra, C.N., 1987, Gene, 60, 65-72).

Les vecteurs M48-ALD et "PGK-néomycine" ont été co-transfectés dans une lignée cellulaire

d'encapsulation amphotrope ψ CRIP par l'intermédiaire d'une coprécipitation ADN-phosphate de calcium. Les cellules transfectées ont été sélectionnées dans un milieu contenant du G418 (1mg de base active par millilitre, GIBCO/BRL). Des clones ont été isolés par "ringcloning" et amplifiés pour générer des lignées cellulaires. Les clones recombinants M48-ALD ont été sélectionnés sur la base d'essais positifs d'immunofluorescence avec des anticorps anti-ALDp. L'absence de virus "Helper" a été testée par des essais de mobilisation de virus.

Transfert du fragment d'ADNc

Afin de transférer l'ADNc du gène de l'ALD, on a tout d'abord ensemencé des fibroblastes cutanés ALD à 5% de confluence durant les seize heures précédant l'infection. Les cellules ont ensuite été incubées pendant une durée de huit heures avec dix millilitres de surnageant de vecteurs M48-ALD ou Glu-3 fraîchement filtré en présence de polybrène (8 mg/ml, Sigma). L'infection est effectuée à deux reprises, deux jours consécutifs. Après l'infection des fibroblastes ALD, on a sélectionné les clones produisant la plus forte quantité de virus recombinant M48-ALD sur la base du nombre de copies intégrées du provirus M48-ALD intact.

Analyse par Southern Blot

Un Southern blot a alors permis de constater que cette infection a abouti à l'intégration d'environ une copie de provirus par génome. L'ADN génomique avait été isolé et digéré par l'enzyme de restriction KpnI. Cette analyse est plus amplement détaillée dans la publication de Sarde et al. Genomics 22, 13-20, 1994. La sonde utilisée (Ex13) correspond aux nucléotides 1221 à 1829 de l'ADNc du gène de l'ALD.

Anticorps mono et polyclonaux

La production, ainsi que les caractéristiques des anticorps polyclonaux anti-ALDp humaine normale (1D6 et

2B4), ont été décrites dans la publication de Mosser et al. (1994, Hum. mol. Genet. 3, 265-271). Ces deux anticorps n'ont pas présenté de réaction croisée avec l'ALDp de souris.

Analyse par immunoblotting et immunocytofluorescence

Une analyse par "immunoblotting" et immunocytofluorescence a ensuite été effectuée selon un protocole décrit dans ce même document, dans lequel on retrouve également l'intégralité du processus d'extraction cellulaire.

Ainsi, 50×10^3 fibroblastes par millilitre ont été mis en culture pendant seize heures dans des plaques de culture (Nunc), pour être ensuite fixés dans du formaldéhyde à 2% durant quatre minutes, et perméabilisés dans du PBS-Triton à raison de 0,1%. Les cellules ont été ensuite incubées à température ambiante soit avec les anticorps (1D6 ou 2B4) soit avec un anti-sérum de kéto-thiolase ou de catalase peroxysomale dans du PBS-Triton à raison de 0,1%, et avec 500 $\mu\text{g/ml}$ d'IgG d'oie. Des anticorps biotinylés de souris pour 1D6 et 1D4, et de lapin pour la kétothiolase ou la catalase peroxysomale ont été ajoutés à raison de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Vector), et un marquage spécifique a été révélé par l'utilisation de la streptavidine Cy3 (Laboratoires Jackson Immunoresearch) ou la streptavidine fluoresceine (Vector).

Pour les études de co-localisation, des cellules ont tout d'abord été traitées par des anticorps 1D6 ou 2B4, puis par l'anti-sérum de catalase peroxysomale.

Trois séries d'expériences ont été effectuées afin d'exclure les réactions croisées non spécifiques entre anticorps primaires et secondaires. Des cellules ont été incubées avec : 1) des anticorps monoclonaux 106 et des anticorps de lapin marqués à la fluoresceine-avidine D ; 2) un antisérum catalase et des anticorps de souris marqués à la Cy3-Streptavidine ; 3) des anticorps

anti-isotypes (IgGI) de souris biotynilés et de la Cy3-Streptavidine.

Détermination des taux d'acides gras à très longue chaîne et de l'activité β -oxydante du peroxysome

Les concentrations en acides gras à très longue chaîne ont été ensuite mesurées dans des fibroblastes cutanés par l'utilisation d'une technique combinant la spectrométrie de masse et la chromatographie en phase gaz/liquide, selon un protocole décrit par Aubourg P. et al. (1985, J. Lipid Res. 26, 263-267). La capacité des fibroblastes à oxyder l'acide lignocérique en acétate, a été mesurée selon un protocole décrit par Aubourg P. et al. (1993, Ped Res. 34, 270-276).

Transduction rétrovirale d'un ADNc codant pour une ALDp normale dans des fibroblastes de patients atteints de l'ALD

Cette étape a permis d'évaluer si ce transfert était en mesure de corriger les troubles générés par cette maladie. Ainsi que précédemment décrit, la construction de l'invention a été co-transfectée avec le plasmide PGK-néomycine, conférant une résistance à G418 dans les cellules d'enveloppes ψ CRIP, ceci permettant l'isolation de plusieurs lignées cellulaires productrices du virus amphotrope M48-ALD.

Des fibroblastes cutanés ALD ont ensuite fait l'objet d'une transduction avec, soit un surnageant de cellules ψ CRIP productrices de M48-ALD, soit un surnageant des cellules Glu-3- ψ CRIP. Des études basées sur l'immunocytofluorescence ont montré que 75 \pm 6% des fibroblastes du patient JL et 66 \pm 4% des fibroblastes du patient SL exprimaient la protéine recombinante ALDp normale après deux cycles d'infection. L'intégration provirale de M48-ALD intacte fut ensuite démontrée par une analyse par un Southern blot sur des fibroblastes cutanés ALD (figure 2).

Expression in vitro de l'ALDp normale dans des fibroblastes ayant incorporé le vecteur

Afin de déterminer l'effet de la transduction rétrovirale sur l'expression de la protéine recombinante ALDp, des fibroblastes ALD ayant fait l'objet d'une transduction ont été mis en culture à confluence dans un milieu frais, pour être ensuite étudiés par immunocytofluorescence et immunoblotting.

L'immunoblotting de fibroblastes normaux avec des anticorps 1D6 et 2B4 a révélé une protéine spécifique de 75 kDa : l'ALDp (figure 3, ligne 1) (Mosser et al., 1994, Hum. mol. Genet. 3, 265-271). Cette bande à 75 kDa était absente chez les fibroblastes issus du patient JL (figure 3, lignes 4 et 6). Après transduction avec le vecteur M48-ALD, une bande ALDp à 75 kDa était présente chez les fibroblastes des deux patients atteints d'ALD (figure 3, lignes 3 et 5). Si l'on se base sur la mesure de l'intensité de la bande, on peut observer que l'expression de l'ALDp est augmentée de cinq fois par rapport à sa valeur normale dans ces fibroblastes. La bande à 75 kDa n'était pas détectable dans les fibroblastes ALD ayant subi une transduction par le vecteur contrôle Glu-3.

Par utilisation d'immunocytofluorescence indirecte, les anticorps 1D6 et 2B4 ont permis de détecter, avant transduction avec le vecteur M48-ALD, un pointillé de tâches fluorescentes cytoplasmiques dans les fibroblastes des patients SM (figure 4) cependant moins intense que celles observées dans les fibroblastes normaux, mais n'ont pu révéler aucun signal fluorescent pointillé dans les fibroblastes JL.

Après transduction avec le vecteur M48-ALD, une coloration pointillée marquée est réapparue dans les fibroblastes du patient JL (figure 4B) et le motif pointillé augmenta notablement dans les fibroblastes SM (figure 4D). Ces modifications ne furent pas observées

dans les cellules ayant subi une transduction par le vecteur contrôle Glu-3.

Une double immunocytofluorescence indirecte confirma que l'ALDp recombinante était bien peroxysomale. Les fibroblastes du patient JL ayant subi une transduction par le vecteur M48-ALD, ont présenté un signal pointillé rouge lorsqu'une immunocytofluorescence indirecte était effectuée avec des anticorps anti-ALDp marqués par Cy3 (figure 4E), et un signal pointillé vert lorsque une immunocytofluorescence indirecte était effectuée par un antisérum de catalase peroxysomale marqué par la fluoresceine (figure 4F). Une image superposée montra une tâche jaune brun entre les signaux pointillés verts et rouges (figure 4G), indiquant que l'ALD recombinante ainsi que la thiolase peroxysomale endogène étaient co-localisées au niveau du peroxysome, de la même façon que cela avait été observé par Mosser et al. (1994, Hum. mol. Genet. 3, 265-271) dans les fibroblastes normaux.

Aucun agrégat cytosolique ne fut observé dans les deux lignées cellulaires ALD, ceci indiquant que la plupart, si ce n'est toutes les ALDp recombinantes, avaient été correctement incorporées dans les membranes peroxysomales. Ceci atteste le fait que les fibroblastes ALD possèdent un système capable d'intégrer au niveau des peroxysomes de grandes quantités d'ALDp.

Expression à long terme de l'ALDp normale chez des fibroblastes ayant incorporé le vecteur

Les inventeurs ont ensuite étudié l'expression à long terme d'ALDp normale dans des fibroblastes traités par le vecteur de l'invention. L'intensité de la bande à 75 kDa détectée par "immunoblotting" ne présentait pas de différence significative chez les fibroblastes cutanés ALD ayant subi une transduction par le vecteur

M48-ALD et ayant été mis en culture pendant une période de deux mois (c'est-à-dire correspondant à cinq passages) (figure 3, lignes 5 à 7). Par des techniques d'immunofluorescence, aucun abaissement du pourcentage d'expression de l'ALDp recombinante chez les patients JL et SM n'a été observé durant cette période de deux mois.

Correction du métabolisme des acides gras à très longue chaîne chez les fibroblastes ayant incorporé le vecteur

La β -oxydation de l'acide lignocérique (C24:0) avait subi un abaissement de respectivement 27% et 35% dans les fibroblastes des patients JL et SM. Après transduction avec le vecteur M48-ALD de l'invention, ces fibroblastes présentaient des taux de dégradation de l'acide lignocérique normaux (figure 5A).

Pour estimer plus précisément la correction phénotypique, les concentrations d'acides gras à très longue chaîne ont été mesurées dans des fibroblastes ALD avant et après transduction par le vecteur M48-ALD. La figure 5B montre que la teneur en acides gras à très longue chaîne, dans des fibroblastes n'ayant pas subi de transduction des patients SM et JL, était 3,5 à 4 fois supérieure à celle des fibroblastes normaux. La transduction par le vecteur M48-ALD a normalisé la concentration en acide hexacosanoïque de ces fibroblastes (figure 5B), ainsi que les rapports entre acides gras C26:0/C22:0 et C24:0/C22:0. Aucun changement n'a été cependant observé dans les fibroblastes ALD ayant subi une transduction avec le vecteur de contrôle Glu-3. Les taux d'acides à très longue chaîne des fibroblastes ALD ayant subi une transduction et mis en culture pendant une durée de trois mois, sont restés normaux (figure 5B).

D'un point de vue histologique, les travaux effectués par Moser et Moser en 1991 [The Metabolic

Basis of Inherited Disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W. S. & Valle, D.; McGraw-Hill, New York) pp.1511-1532] avaient pu aboutir aux observations suivantes.

Les lésions démyélinisantes causées par l'ALD au niveau du cerveau sont diffuses. Elles concernent souvent le lobe occipital et/ou le lobe frontal, ainsi que les capsules internes. Il est vraisemblable que la démyélinisation observée dans l'ALD est liée à l'accumulation d'acides gras à très longue chaîne au niveau des différentes fractions lipidiques de la myéline, entraînant ainsi une altération de leurs propriétés physiques ainsi qu'une déstabilisation de la membrane myélinique.

Des vecteurs adénoviraux ou herpétiques non répliquants ont été proposés pour des injections stéréotactiques dans le but d'introduire des gènes étrangers au niveau de différentes zones du cerveau. Cette approche ne convient cependant pas au cas de l'ALD puisque cela nécessiterait de nombreuses injections au niveau des différents sites du cerveau.

Les récents travaux de Altman (Altman, J. 1994, Trends Neurosci. 17, 47-49) ont montré que jusqu'à 20% des cellules gliales sont des cellules de la microglie. Bien que le remplacement des cellules fixes de la microglie soit une question encore controversée, plusieurs constatations suggèrent que les monocytes dérivés des cellules hématopoïétiques périphériques puissent traverser la barrière sanguine du cerveau, pénétrer le parenchyme cervical et se différencier en cellules microgliales (Altman, J. 1994, Trends Neurosci. 17, 47-49 ; Hickey, W.F. & Kimura H. 1988, Science 239, 290-292).

La transplantation de moelle osseuse permet l'amélioration de plusieurs désordres neurodégénératifs, et cela s'explique par le

remplacement de cellules microgliales anormales grâce à l'apport de nouvelles cellules hématopoïétiques [Krivit, W. & Shapiro, E. 1991, in Treatment of genetic disorders (Desnick, R.J.; Churchill Livingstone, New-York) pp.203-221].

Les travaux de Aubourg et al. (1990 New Engl. J. Med. 322, 1860-1866) ont démontré que concernant l'ALD, une transplantation allogénique de moelle osseuse peut réverser, ou stopper, la démyélinisation lorsque celle-ci est effectuée sur des enfants présentant des lésions démyélinisantes modérées et à progression lente. Cette procédure requiert cependant un donneur parfaitement histocompatible, tout en comportant des risques importants, y compris une violente réaction des cellules donneuses contre les cellules hôtes.

Afin de circonvenir ces problèmes, les inventeurs ont considéré qu'une transplantation de moelle osseuse à caractère autologue, suite à l'insertion du gène normal de l'ALD, pourrait constituer une approche alternative. Une première étape nous a permis de déterminer si le transfert in vitro de l'ADNc normal de l'ALD pouvait corriger le phénotype des fibroblastes ALD.

On a donc construit un vecteur rétroviral recombinant M48-ALD permettant l'insertion ainsi que l'expression du ADNc normal de l'ALD humain. Cette construction a par la suite été testée dans des fibroblastes cutanés de patients n'ayant aucun lien de parenté. Avant la transduction par le vecteur M48-ALD, l'ALDp était absente au niveau de l'une des lignées des cellules mutées et présente mais défectueuse dans l'autre.

Après transduction par le vecteur recombinant M48-ALD, l'ALDp recombinante abondamment exprimée fut normalement incorporée dans les peroxysomes des fibroblastes des deux patients. La distribution

cellulaire de l'ALDp recombinante était diffuse comme dans les fibroblastes normaux, et co-localisée avec la cétothiolase peroxysomale. Bien que l'ALDp était surexprimée, aucun agrégat d'ALDp n'a été observé dans le cytosol, comme c'est le cas dans une lignée de cellules particulières de Zellweger (GM6231). Ces résultats confirment le fait que la plupart, si ce n'est toutes les protéines recombinantes ALDp, étaient correctement localisées au niveau des peroxysomes.

Il a été montré par Moser et Moser [The Metabolic Basis of Inherited Disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.; McGraw-Hill, New York) pp.1511-1532] et par Singh et al. (Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.81,4203-4207) que l'oxydation de l'acide lignocérique, un substrat de la β -oxydation peroxysomale, était réduite de 20 à 35% de la normale dans les fibroblastes ALD.

Le transfert de gène utilisant les moyens décrits dans la présente invention a permis de normaliser complètement ce défaut d'oxydation. En conséquence, la teneur en acides gras à très longue chaîne est redevenue normale au niveau des lignées cellulaires de fibroblastes des patients chez qui ces acides gras avaient été accumulés. Ces résultats indiquent que l'ALDp recombinante localisée au niveau de la membrane peroxysomale était fonctionnelle et permettait une restauration totale de l'activité de la synthétase qui permet d'associer les acides gras à très longue chaîne déficiente en ALDp. L'expression stable d'ADLp ainsi qu'une correction métabolique prolongée était obtenue pour trois mois.

Puisque des vecteurs rétroviraux peuvent efficacement transférer, ainsi qu'exprimer, des quantités physiologiques de glucocérébrosidase dans des cellules hématopoïétiques à longue vie de la moelle osseuse chez des patients atteints de la maladie de

Gaucher (Nolta J.A. et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 342-348), on devrait obtenir des résultats similaires avec l'ALDp chez les patients atteints d'adrénoleucodystrophie.

REVENDICATIONS

1. Vecteur rétroviral recombinant caractérisé en ce qu'il comprend :

- un fragment d'un ADNc du gène dont la mutation est responsable d'adrénoleucodystrophie ou d'adrénoneuromyélopathie et qui code pour une protéine membranaire,
- un vecteur rétroviral M48 dans lequel ledit fragment d'ADN complémentaire est inséré au niveau d'un site de restriction BamHI.

2. Vecteur rétroviral recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'ADNc est un fragment SpeI-EcoRI d'une longueur de 2,43 kb.

3. Vecteur rétroviral recombinant selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'expression de l'ADNc est sous le contrôle d'un LTR ou de tout autre promoteur actif dans les cellules souches hématopoïétiques, les cellules gliales, notamment les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

4. Vecteur rétroviral recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond au schéma de la figure 1.

5. Vecteur rétroviral recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que le fragment d'ADNc code pour une protéine capable de s'intégrer dans la membrane d'un organe cellulaire, le peroxysome.

6. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le vecteur rétroviral M48 est remplacé par un "adeno-associated virus", un adénovirus ou un autre vecteur rétroviral, notamment MFG.

7. Cellules recombinantes caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules ayant la capacité d'être tolérées immunologiquement par un organisme auquel

elles seraient administrées, modifiées par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Cellules recombinantes selon la revendication 7, caractérisées en qu'il s'agit de fibroblastes cutanés.

9. Cellules recombinantes selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules hématopoïétiques souches, en particulier de cellules précoces, notamment la population cellulaire CT 34⁺.

10. Cellules recombinantes selon la revendication 9, caractérisées en ce que M48 est remplacé par AAV.

11. Cellules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules constitutives du système nerveux, notamment d'oligodendrocytes ou de cellules microgliales.

12. Utilisation d'un vecteur ou d'une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la préparation d'un médicament servant au traitement des maladies susceptibles d'être corrigées par l'expression du fragment d'ADNc de la revendication 1.

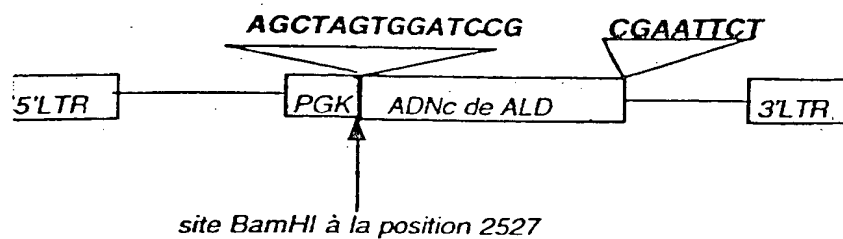


FIGURE 1

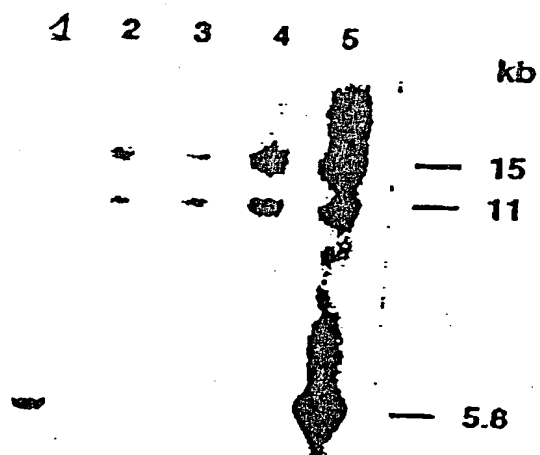


FIGURE 2

2/6

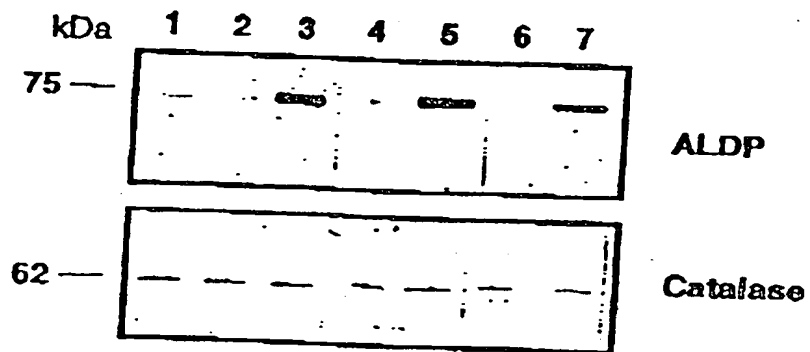
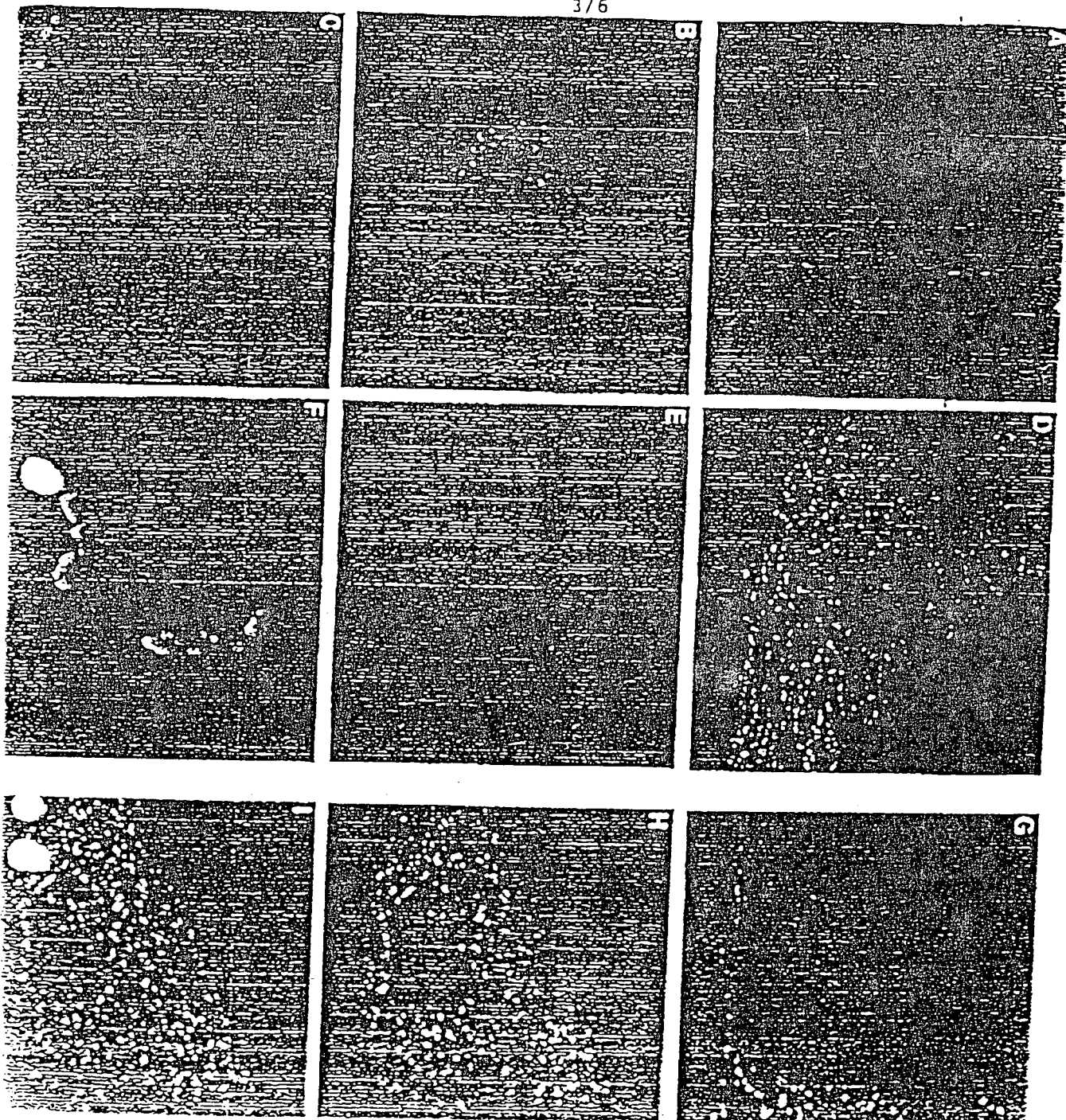
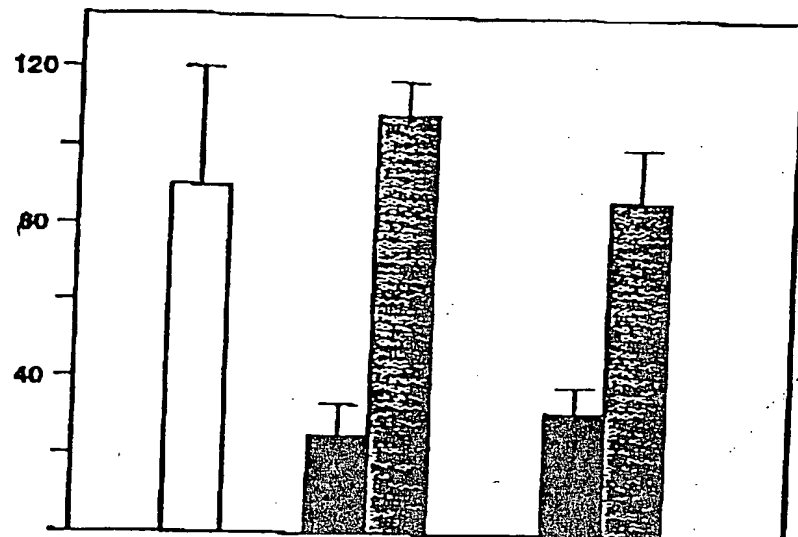


FIGURE 3

3/6



oxydation de l'acide lignocérique
(pmol/f/ng de protéine)

A

Teneur en acide hexacosanoïque
($\mu\text{g}/\text{ng}$ ac protéine)

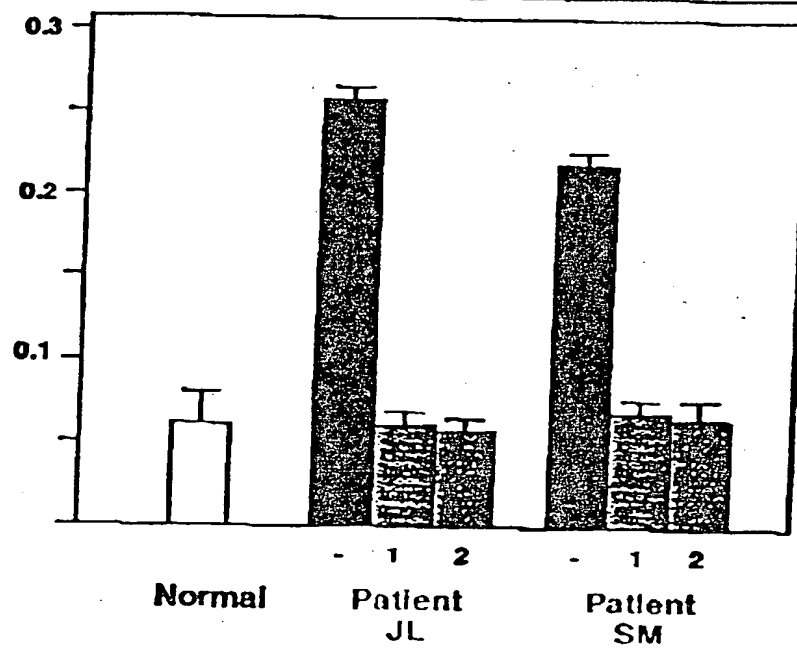
B

FIGURE 5

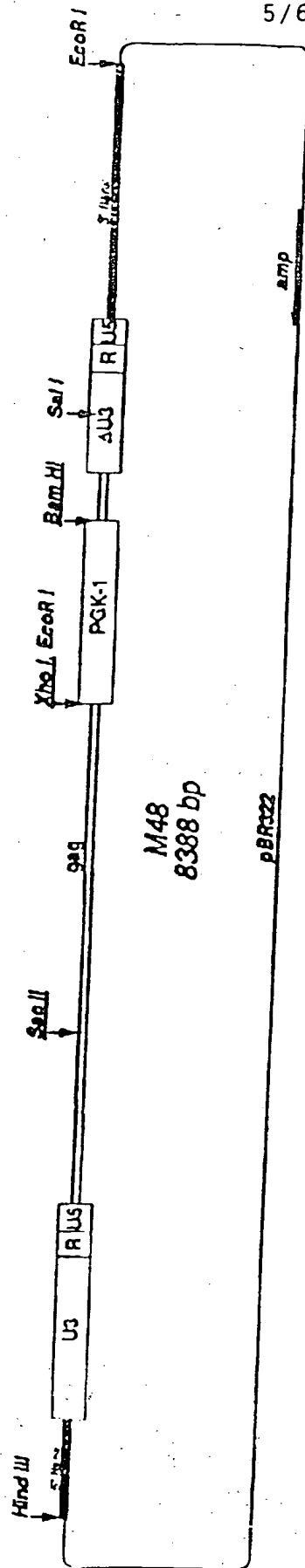


FIGURE 6

[illegible]

Figure 7

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revenclutions concernées de la demande européenne
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EUROPEAN NEUROLOGY, vol. 34, no. 5, Octobre 1994 KARGER, BASEL, CH, pages 241-242, H. W. MOSER ET AL. 'gene therapy in neurology' en entier	1-12
D,A	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 3, no. 2, Février 1994 OXFORD UNIVERSITY PRESS, UK, pages 265-271, J. MOSSER ET AL. 'The gene responsable for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein' en entier	1-12
D,A	NATURE, vol. 361, 25 Février 1993 MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 726-730, J. MOSSER ET AL. 'Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters' en entier	1-12
D,A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 89, no. 23, 1 Décembre 1992 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 11332-11336, T. OHASHI ET AL. 'Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector' en entier	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) C12N C07K A61K
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
19 Septembre 1995		Hornig, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'essence d'un soutien une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document prioritaire T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 509271
FR 9500376

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande concernée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDCINE, vol. 322, no. 26, 28 Juin 1990 MA. MED. SOC., BOSTON, MA, US, pages 1860-1866, P. AUBOURG ET AL. 'Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation' en entier ---	1-12
D,A	J. VIROLOGY, vol. 62, no. 10-10, Octobre 1988 AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 3795-3801, B.C. GUILD ET AL. 'Development of retrovirus vectors useful for expressing genes in cultured murine embryonal cells and hematopoietic cells in vivo' en entier ---	1-12
A	NATURE GENETICS, vol. 8, Octobre 1994 NATURE PUBLISHING CO., NEW YORK, US, pages 148-154, M.G. KAPLITT ET AL. 'Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vector in the mammalian brain' en entier --- -/--	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
19 Septembre 1995		Hornig, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'exposé d'un aspect une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite F : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
ISO FORM 150 (04/91) (P04C11)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 509271
FR 9500376

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	NEUROLOGY VOL. 44 (4 SUUPL. 2), 1994 page A163 M.G. KAPLITT ET AL. 'Adenovirus-associated virus (AAV) vectors for genetic therapy of neurological disease' 46th Annual meeting of the american academy of neurology, Washington, DC, USA; May 1-7, 1994; * abrégé *	1-12
A	GENE THERAPY, vol. 1, no. s1, 1993 page S80 L. TENNENBAUM ET AL. 'Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene transfer into glial cells of the human central nervous system' Gene transfer into neurones: from basic applications to gene therapy; 16-18 August 1993; University of Wales, College of cardiff, UK * abrégé *	1-12
E	DATABASE WPI Section Ch, Week 9529 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 95-215721 & CA-A-2 108 606 (INST NAT SANTE & RECH MEDICALE), 16 Avril 1995 * abrégé *	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (art. CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 Septembre 1995		Hornig, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'ensemble d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document prioritaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : nombre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1500 (04/91) (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 509271
FR 9500376

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande encadrée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1995), 92(5), 1674-8 CODEN: PNASAG; ISSN: 0027-8424, 28 Février 1995 CARTIER, NATHALIE ET AL 'Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts' en entier	1-12
T	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 210 (3). 1995. 830-836. ISSN: 0006-291X, 15 Mai 1995 SHINNOH N ET AL 'Adrenoleukodystrophy: The restoration of peroxisomal beta-oxidation by transfection of normal cDNA.' en entier	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (art. C.L. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Rechercheur
19 Septembre 1995		Hornig, H
<p>CATEGORIES DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un ou de plusieurs revendications ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 150 (01.92) (Pec.11)

THIS PAGE BLANK (USPTO).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)